

29. 3. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 3 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 3 2 4 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 3 2 4 3]

出 願 人 株式会社林原生物化学研究所
Applicant(s):

REC'D 21 MAY 2004

WIPO

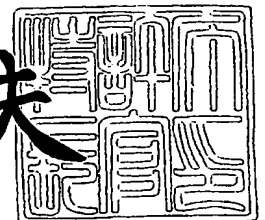
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 3 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 10100601

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 A61K 39/35
C07K 14/315
A61P 37/00
A61K 38/48

【発明者】

【住所又は居所】 東京都練馬区向山 3 丁目 1 4 7 2 番地 5

【氏名】 西澤 俊樹

【特許出願人】

【識別番号】 000155908

【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

【代表者】 林原 健

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035736

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ポリペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アミノ末端側に T 細胞エпитープのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有し、リンカーペプチドをはさんで、そのカルボキシ末端側に B 細胞エピトープのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有するペプチド内に、1 種又は 2 種以上の細胞接着分子の細胞結合モチーフのアミノ酸配列を 1 種又は 2 種以上有することを特徴とするポリペプチド。

【請求項 2】 リンカーペプチドがプロテアーゼの認識配列であることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】 リンカーペプチドが抗原プロセッシングに關与するプロテアーゼの認識配列であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4】 リンカーペプチドが、配列表における配列番号 1 記載のアミノ酸配列、配列番号 2 記載のアミノ酸配列、配列番号 3 記載のアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれる何れか 1 種又は 2 種以上で構成されていることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5】 細胞接着分子の細胞結合モチーフが、インテグリンファミリー結合モチーフ、及び、その他の細胞結合モチーフのアミノ酸配列から選ばれる何れか 1 種又は 2 種以上であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 記載のポリペプチド。

【請求項 6】 細胞結合モチーフが、配列表における配列番号 4 記載のアミノ酸配列、配列番号 5 記載のアミノ酸配列、配列番号 6 記載のアミノ酸配列、配列番号 7 記載のアミノ酸配列、配列番号 8 記載のアミノ酸配列、配列番号 9 記載のアミノ酸配列、配列番号 10 記載のアミノ酸配列、配列番号 11 記載のアミノ酸配列、又は、配列番号 12 記載のアミノ酸配列、配列番号 13 記載のアミノ酸配列を有するペプチドから選ばれる何れか 1 種又は 2 種以上であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 記載のポリペプチド。

【請求項 7】 T 細胞エピトープペプチドが、複数の主要組織適合性抗原 (MHC) クラス II のハプロタイプで同時に認識される T 細胞エピトープであること

を特徴とする請求 1 乃至 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 8】 B 細胞エピトープペプチドが、目的とする特異抗体を誘導できるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 1 乃至 7 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 9】 B 細胞エピトープペプチドが、ワクチン効果を有する抗体を誘導できるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 1 乃至 8 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 10】 B 細胞エピトープペプチドが、ストレプトコカス・ミュータンス セロタイプ C 菌の表層蛋白質抗原由来であることを特徴とする請求項 1 乃至 9 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 11】 B 細胞エピトープペプチドが、配列番号 14 記載のアミノ酸配列のペプチドであることを特徴とする請求項 10 記載のポリペプチド。

【請求項 12】 う蝕予防効果のある抗体の産生を増強することができることを特徴とする請求項 1 乃至 11 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 13】 免疫アジュバントの非存在下で、経粘膜投与により抗体産生を誘導できることを特徴とする請求項 1 乃至 12 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 14】 請求項 1 乃至 13 の何れかに記載のポリペプチドを有効成分として含有する抗体産生の増強のために使用する組成物。

【請求項 15】 請求項 1 乃至 13 の何れかに記載のポリペプチド以外の免疫アジュバント活性を有する成分を含有することを特徴とする請求項 14 記載の組成物。

【請求項 16】 製剤学的に許容しうる 1 種又は 2 種以上の製剤用添加剤を含有することを特徴とする請求項 14 又は 15 記載の組成物。

【請求項 17】 経皮、皮下、皮内、筋肉内、血管内、腹腔内、胸腔内及び経粘膜から選ばれる何れか 1 種又は 2 種以上の経路で投与することを特徴とする請求項 1 乃至 16 の何れかに記載のポリペプチド又はこのポリペプチドを含有する組成物。

【請求項 18】 粘膜が、鼻腔内、口腔内、眼、咽喉、膈内、及び、消化管内に存在するものから選ばれる何れか 1 種又は 2 種以上である請求項 17 記載のポリ

ペプチド又はこのポリペプチドを含有する組成物。

【請求項 19】 ワクチンとして使用することを特徴とする請求項 1 乃至 18 記載のポリペプチド又はこのポリペプチドを含有する組成物。

【請求項 20】 免疫アジュバントとして使用することを特徴とする請求項 1 乃至 18 記載のポリペプチド又はこのポリペプチドを含有する組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は特定の抗原エピトープを含み、免疫アジュバント非存在下においても、経粘膜投与により、この抗原エピトープに対する特異抗体の産生を効率よく誘導するポリペプチド、このポリペプチドを含有する組成物およびその用途に関し、より詳細には、抗体産生の対象となる抗原の B 細胞エピトープを含むポリペプチドと T 細胞エピトープを、プロテアーゼの認識配列のアミノ酸からなるリンカーペプチドで連結し、このポリペプチドに、さらに、細胞結合モチーフのアミノ酸配列からなるペプチドを連結した、目的抗体の産生を効率よく誘導するポリペプチド、このポリペプチドを含有する組成物及びその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

【特許文献 1】 特開平 6-122633 号公報

【特許文献 2】 特表 2002-511422 号公報

【特許文献 3】 特表平 8-504118 号公報

【非特許文献 1】 ラベル, イー, シー、(Lavelle, E., C...), 『イムノロジー (Immunology)』、第 99 巻、第 30~37 頁 (2000 年)

【非特許文献 2】 西沢俊樹、今井奨、花田信弘、第 4 回日本ワクチン学会学術集会プログラム・抄録集、第 77 頁 (2000 年)

【非特許文献 3】 オオイシ, ワイ (Y) 等、『オーラル マイクロバイオロジー アンド イムノロジー (Oral Microbiology and Immunology)』、第 16 巻、第 40~44 頁 (2001 年)

【0003】

生体に、特定の抗原に対して特異的な抗体産生のみを誘導する場合には、精製した抗原を単独で、或いは、抗体産生を増強する活性を有する免疫アジュバントと共に生体に投与する方法が一般的に用いられてきた。この方法は、種々の感染症に対する最も有効な予防手段としても汎用されており、特に抗生物質が無効であるウイルスや、微生物が産生する毒素などのように、他に有効な予防或いは治療方法がない場合には、生体に、これらのウイルスや毒素に対する抗体産生を誘導し、防御することが唯一の対策である場合も多い。現在この方法が実用化されているものとしては、病原微生物を有機溶媒や紫外線照射等で不活化して感染性を無くした不活化ワクチンか、病原体を弱毒化して生体への病原性を弱めた弱毒化ワクチンであり、ポリオウイルスワクチンを除き、全て注射により非経口的に投与されている。しかしながら、不活化ワクチンの場合、防御に必要な抗体価を得るためには数回の注射を繰り返す必要があり、生体への負担が大きく利便性にも劣っているとの問題を抱えている。

【0004】

また、生ワクチンの場合、保存安定性に欠けるだけでなく、ワクチン投与後に突然変異を起こし強毒化株となり生体に害を引き起こす可能性がある。さらには、不活化ワクチン、生ワクチンとも生体に対してアナフィラキシーショックを与えることもあり、安全性に欠ける面があった。さらにウイルス粒子そのもの、或いは、蛋白巨大分子を免疫原として用いるため、ワクチン製剤とした際の安定性に欠け、安定性を保持するためヒト血清アルブミンやゼラチン等を製剤の安定剤として用いる場合もあった。このためこれら安定剤に用いた物質に未知の感染性微生物の混入が否定できないこと、或いは、安定剤に対する生体のアナフィラキシーショックが生じることもあり、安全性、安定性に欠けるものであった。また大部分のワクチンは注射剤として製剤化されているものの、感染症の発生により多くの人命が奪われている地域の多くは発展途上国であり、ワクチンの普及を図るには安定性に優れた製剤で、かつ、注射剤以外のより簡便な投与が可能なワクチン製剤が求められている。

【0005】

これらの課題を解決するために、不活化ワクチンや生ワクチンよりも高い安全性と有効性をもつ、不活化ワクチンや生ワクチンの部分アミノ酸配列からなるポリペプチドを利用した新型ワクチンの開発研究が世界中で鋭意進められており、B型肝炎ウイルスワクチンに代表される組み換え型ワクチンやコンポーネントワクチンは、その新型ワクチンの代表例であるが、これらのポリペプチドを使用したワクチンが、未だ実用化段階に移行しないのは、ポリペプチド上の抗原エピトープが、生体が個別にもつ主要組織適合性抗原（以下、「MHC」と略記する。）のクラスIIハプロタイプの拘束性により異なることに加えて、短鎖ポリペプチドは免疫原性が弱く、このポリペプチドを投与しても生体に対して十分な抗体を誘導しないという欠点に起因する。また、経粘膜投与時の抗原の免疫原性を高める方法としては、対象とする抗原とともに、コレラ毒素（以下、「CT」と略記する。）や大腸菌由来の熱不安定型のエンテロトキシンや、これらのアミノ酸配列の一部を置換して弱毒化したものを免疫アジュバントとして投与する方法が知られてはいるものの（非特許文献1参照）、目的とする抗原以外に、免疫アジュバントとして使用したコレラ毒素や大腸菌由来の熱不安定型のエンテロトキシンに対する抗体が産生されるなどの問題があり、実用に供されていない。

【0006】

一方、歯科における微生物が原因とされる二大疾患には、う蝕症と歯周病があり、これらは、一般的な疾患で、且つ、致命的でないために、その予防や治療にはより高度な安全性が求められている。このう蝕症予防の手段として、例えば特許文献1には、ストレプトコッカス・ミュータンス菌由来の歯面への付着性を有する蛋白質の断片ペプチドで免疫した動物の抗体を利用する（受動免疫）方法が開示されており、特許文献2においては、ストレプトコッカス・ミュータンス由来のT細胞エピトープに、同じストレプトコッカス・ミュータンス菌由来のB細胞エピトープ（グルカンバインディング蛋白質）からなるう蝕予防用のワクチンが記載されている。

【0007】

また、これとは別に、本発明者は、う蝕予防効果があることが知られているストレプトコッカス・ミュータンス セロタイプC (Streptococcus

mutans serotype C) の歯面への初期付着に関与する表層蛋白質抗原 (以下、「PAc」と略記する。) に対する抗体の産生を誘導する系を実験モデルとして使用し、経粘膜投与により、免疫アジュバント非存在下でも、複数のMHCクラスIIのハプロタイプ (遺伝子型) の個体において、PAcに対する抗体産生を効率的に誘導できる短鎖ポリペプチドを開発する目的で、研究を行ってきた。すなわち、PAcのアミノ末端から365～377番目までアミノ酸配列であるところの配列表における配列番号14記載ののアミノ酸配列を有するペプチドをB細胞エピトープとして使用し、このペプチドのアミノ末端側に、複数のMHCクラスIIのハプロタイプの拘束を同時に受けるT細胞エピトープを結合し、その間を配列表における配列番号1の配列からなるジペプチドのリンカーで、直線的に連結することにより、う蝕を抑制することのできる抗体の産生を増強する方法を提案した (非特許文献2及び非特許文献3参照)。しかしながら、これらのポリペプチドも免疫アジュバント非存在下で経粘膜的に投与した場合には、免疫原性が弱く、ポリペプチドを投与しても生体に対して十分な抗体を誘導しないという欠点が解決できなかった。さらに、特許文献3には、T細胞エピトープのカルボキシル末端側にB細胞エピトープを結合したトラコーマクラミジアの感染防止用の合成ペプチドワクチンが開示されているものの、これらの文献には、アミノ末端にT細胞エピトープを有し、そのカルボキシル末端側にプロテアーゼの認識配列からなるリンカーペプチドを挟んでB細胞エピトープを結合し、さらに細胞結合モチーフと相同のアミノ酸配列を附加したポリペプチドの記載はなく、また、このポリペプチドが、免疫アジュバントなしに経粘膜投与した場合でも、目的とする特異抗体の産生が誘導できることや、その用量についての記載や示唆はない。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために、う蝕の原因となる微生物のストレプトコッカス ミュータンスのPAc (菌体表層蛋白質抗原) 由来の断片ペプチドをモデルとして使用して、う蝕の原因となる微生物の感染防御に有効な抗体の産生を増強できるポリペプチドの研究を進めてきた。その結果、ポリペプチドのア

ミノ末端側に複数のMHCクラスIIのハプロタイプで同時に拘束されるT細胞エピトープ配列をもち、リンカーペプチドとしてプロテアーゼの認識アミノ酸配列を挟んで、カルボキシル末端側に抗体誘導用のB細胞エピトープを有し、さらに、このポリペプチドに細胞結合モチーフと相同なアミノ酸配列を有するペプチドを結合したポリペプチドが、免疫アジュバント非存在下で経粘膜投与した場合において、複数のMHCクラスIIのハプロタイプにおいて、目的とする抗原に対する特異抗体の十分な産生を効率よく増強し、しかも、目的とする特異抗体以外の抗体の産生誘導能が低く、また、アナフラキシーなどの副作用を誘発しない、安全性の高いポリペプチドであることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

本発明のポリペプチドにおいて、抗体産生を誘発する部位として使用するののは、B細胞エピトープ或いはそれを含むアミノ酸配列部分である。また、このペプチドのアミノ酸配列は、微生物、毒素、アレルゲン、酵素等に由来の抗原であって、その各々について文献的に既に明らかにされている既知の抗原エピトープのアミノ酸配列そのものでもよく、また実際に生体に対して免疫原性をもつ様々な抗原そのもの、或いは、常法により、抗原の部分ペプチドを免疫してエピトープ配列を同定し、この同定したアミノ酸配列を有するポリペプチドをB細胞エピトープとして用いてもよい。また、このB細胞エピトープは、後述のT細胞エピトープと同じ抗原上にあるものでもよく、B細胞エピトープとそのアミノ酸配列の一部又は全部を共有していてもよい。従って、B細胞エピトープ部分については、感染防御、癌、腫瘍、潰瘍、肝炎など炎症性疾患、アレルギー、アトピーなどの免疫性疾患などの予防や治療、酵素の中和、臨床検査などに使用される各種抗原の検出などのそれぞれの目的に応じて好ましい抗原ポリペプチドを選択することが出来、それらの目的とする抗原ポリペプチドに対して特異的に結合し、及び／又は、中和活性を有する、IgM抗体、IgG抗体及び／又はIgA抗体を特異的に誘導したり、酵素の活性部位に特異的な抗体を誘導することで、予防効果や治療効果に優れた抗体や、抗原特異性の高い抗体を誘導できる種々のポリペプチドを設計することができる。例えば、う蝕予防用の抗体を誘導するためには、非特許文献2に記載の前記P A cの断片ペプチドを使用することができ、具体

的には、配列表における配列番号 14 記載のアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。これらの B 細胞エпитープを含むポリペプチドはそのまま使用してもよく、タンデムに連結して、その 2 量体或いは 3 量体として使用してもよい。なお、目的とする抗原全体に対する抗体を生産する場合には、目的とする抗原をそのまま B 細胞エпитープとして使用することも、当然、本発明に含まれる。また、2 種以上の B 細胞エпитープを 1 個又 2 個以上をタンデムに連結することにより、1 つのポリペプチドで 2 種以上の抗原又は同一抗原上の異なるエпитープに対する抗体を産生できるポリペプチドを設計することも随意である。この場合には、各 B 細胞エпитープの間に、後述のリンカーペプチドを挿入することにより、個々のエпитープのプロセッシングをより確実に行わせることもできる。

【0010】

また、本発明のポリペプチドに使用する、T 細胞エпитープを含むポリペプチドのアミノ酸配列とは、投与の対象となるヒトを含む哺乳動物、鳥類、は虫類、または、魚類の MHC クラス II のハプロタイプに拘束され、ヘルパー T 細胞用抗原として提示を受けるアミノ酸配列或いは、それを含むアミノ酸配列のものであれば何れでもよい。このポリペプチドのアミノ酸配列は、文献的に既に明らかにされている T 細胞エпитープのアミノ酸配列を利用してもよく、また、実際に生体に対して、常法により、抗原の部分ペプチドを免疫してエпитープ配列を同定し、この同定したアミノ酸配列を有するポリペプチドを T 細胞エпитープとして用いてもよい。この T 細胞エпитープは、前述した B 細胞エпитープを含む抗原上にあってもよく、B 細胞エпитープとそのアミノ酸配列の一部又は全部を共有していてもよい。これらの T 細胞エпитープペプチドはそのまま使用してもよく、タンデムに連結して、その 2 量体或いは 3 量体を使用してもよい。さらに、目的とする抗体が、感染防御や抗アレルギー等の予防、治療目的の場合には、複数の MHC クラス II のハプロタイプの拘束を受けるアミノ酸配列（以下、「アグレトープ」という）を同一分子上に含むアミノ酸 20 残基程度のマルチアグレトープ型ペプチド抗原を使用することが、幅広い MHC クラス II のハプロタイプの個体に抗体を誘導できる点から望ましい。また、このアグレトープは、その

ペプチド内に、異なるMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されるアミノ酸配列を複数、タンデムに保持していてもいいし、その一部が重複していてもよく、単独のエピトープが複数のMHCクラスIIのハプロタイプに拘束を受けるものであってもよく、これらの組み合わせであってもよい。通常は、複数のエピトープの一部が重なって存在する重複・シフト型のマルチアグレトープ型ペプチド(Overlapping Multiagretope Peptide)が、短鎖のポリペプチドでありながら、幅広いMHCクラスIIのハプロタイプによる拘束を効率よくカバーすることから、合成や取り扱いの点で望ましい。また、現在、MHCクラスIIのハプロタイプによる拘束性ペプチドの基本構造およびアグレトープとなるアミノ酸配列の多くは、文献的に明らかにされており、これらを参考に、使用目的に併せてT細胞エピトープを含むペプチドを人為的に設計することも随意である。また、ヒトを含む多種の動物のMHCクラスIIのハプロタイプによる拘束を受けるT細胞エピトープを選択することにより、複数の動物に使用可能なポリペプチドを設計することも随意である。

【0011】

前記のB細胞エピトープを含むポリペプチドとT細胞エピトープを含むポリペプチドとを、直接連結したポリペプチドでは目的のB細胞エピトープ以外の構造を認識する抗体を誘導することを避けることができず、しかも、T細胞エピトープを含むポリペプチドとB細胞エピトープを含むポリペプチドとはそれぞれ単独で免疫しても、目的とする抗体の効率的な産生の増強は望めない。従って、本発明のポリペプチドは、免疫原性に優れ、生体に防御効果を示すために十分な抗ペプチド抗体の産生を増強することを可能するために、抗原提示におけるプロセシングのプロセスを考慮して、T細胞エピトープとB細胞エピトープの間にプロテアーゼの認識配列となるアミノ酸配列からなるリンカーペプチドを挿入する。本発明で、B細胞エピトープを含むペプチドとT細胞エピトープと結合するためのリンカーペプチドは、抗原プロセッシングに関与するプロテアーゼの認識配列であれば何れでもよく、具体的には、配列表における配列番号1記載のアミノ酸配列、配列番号2記載のアミノ酸配列、配列番号3記載のアミノ酸配列などのジペプチドを挙げることができ、なかでも、カテプシンBの認識配列である、配列表

における配列番号1記載のリジン-リジンからなるアミノ配列のジペプチド（以下、「KK」と略記する。）を使用することが望ましい。なお、同一の分子上に、T細胞エピトープとB細胞エピトープが重複して存在するような場合には、同一のポリペプチドをリンカーペプチドで連結することにより、それぞれを、T細胞エピトープ機能或いはB細胞エピトープとして使用することも随意である。

【0012】

本発明で使用する細胞接着分子の細胞結合モチーフと相同のアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、インテグリンファミリーに対する結合モチーフをはじめとし、その他の細胞結合モチーフのアミノ酸配列を有するペプチドであれば何れでもよく、例えば、フィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、フィブリノーゲン、ラミニン、HIVのTatタンパク質等々の細胞接着分子上に存在するインテグリン結合モチーフに属する、配列表における配列番号4記載のアミノ酸配列、配列番号5記載のアミノ酸配列（以下、「RED」と略記する。）、配列番号6記載のアミノ酸配列（以下、「LDV」と略記する。）、配列番号7記載のアミノ酸配列（以下、「PHSRN」と略記する。）、配列番号8記載のアミノ酸配列（以下、「KKK」と略記する。）、配列番号9記載のアミノ酸配列（以下、「DGEA」と略記する。）などのアミノ酸配列のペプチドがよく、インテグリンのファミリー以外でも、ラミニン分子上に存在する上記インテグリン結合モチーフ以外の細胞結合モチーフである配列番号10記載のアミノ酸配列（以下、「YIGSR」と略記する。）、配列番号11記載のアミノ酸配列（以下、「IKVAV」と略記する。）、配列番号12記載のアミノ酸配列（以下、「RFYVVMWK」と略記する。）、配列番号13記載のアミノ酸配列（以下、「IRVVM」と略記する。）などのアミノ酸配列のペプチドを挙げることができ、なかでも、RGD、RED、YIGSRのアミノ酸配列からなるペプチドが、特異的な抗体産生の誘導能が強いことから望ましい。また、これら細胞結合モチーフのアミノ酸配列を有するペプチドの連結部位は、T細胞エピトープ及び／又はB細胞エピトープのアミノ末端及び／又はカルボキシル末端から選ばれ1又は2カ所以上に連結することができる。とりわけ、T細胞エピトープのアミノ末端及び／又はカルボキシル末端から選ばれ1又は2カ所に連結した場合

が、特異的な抗体産生を強く増強することから望ましい。

【0013】

本発明のポリペプチドを製造するための方法に限定はなく、慣用のペプチド合成法によるか、或いは、慣用のペプチド合成法によりあらかじめ、部分的に合成したペプチド同士を結合して、調製することができる（例えば、社団法人日本生化学会編「新生化学実験講座」、第1巻、「タンパク質VI」、第3～44頁、1992年、東京化学同人発行参照。）。また当該ペプチドは、各メーカーから市販されているペプチドシンセサイザーを用いて装置のプロトコールに従って合成することができる。本発明のポリペプチドは化学合成により調製されたものに限定されず、組換えDNA技術により調製したものであってもよく、例えば、設計したポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、これを自立増殖可能なベクターに挿入したものを大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母、ヒトを含む動物の細胞等の宿主に導入して形質転換体とし、その培養物から本発明のポリペプチドを採取してもよい。さらに、ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを、動物体、植物体、或いは、菌体に導入して、これらから本発明のポリペプチドを採取してもよい。また、常法により、微生物、細胞、アレルゲンなどから、目的とする抗原ペプチドを抽出、精製して使用してもよいし、これらを低分子に分解して使用することも自由である。さらには、本発明のポリペプチドを発現させた菌体、動物体或いは植物体をそのまま加工して、本発明のポリペプチドを含有する経口摂取用の組成物として使用することも随意である。また、本発明のポリペプチドは、前記の何れかの方法により、その全アミノ酸配列を有するポリペプチドを直接調製してもよく、或いは、予め、その一部アミノ酸配列を有するポリペプチドを合成したものの同士を、結合して調製することも随意である。

【0014】

本発明のポリペプチドは、特異的な抗体産生の誘導のために、このまま単独で、或いは、同一のB細胞エピトープを有するポリペプチドを複数組み合わせ使用することができる。さらに、複数の抗原に対する抗体を同時に産生させる場合には、個々の抗原に対応するB細胞エピトープを有するポリペプチドの1種、又は、2種以上を組み合わせ使用することも随意である。また、本発明の効果を

妨げない限り、本発明のポリペプチドに、製剤学的に許容できる 1 種又は 2 種以上の製剤用添加剤を組み合わせた組成物を調製することも有利に実施できる。このむ製剤用の添加剤としては、グルコース、マルトース、トレハロース、ショ糖などの還元性或いは非還元性の糖、ソルビトール、マンニトール、マルチトールなどの糖アルコール、アミノ酸の 1 種又は 2 種以上、寒天、プルラン、グアガム、アラビアガムなどの水溶性高分子、脂質、ゼラチンなどのタンパク質やポリペプチド、それらの加水分解物、その他の緩衝剤、安定化剤、抗菌剤、香料、栄養機能食品、医薬部外品或いは医薬品の有効成分などの 1 種又は 2 種以上を適宜組み合わせ使用でき、ミョウバン、水酸化アルミニウムやその他の免疫アジュバントと併用することも、当然、本発明に含まれる。また、本発明のポリペプチドを含有する製剤の形態は、その製剤中のポリペプチドが長期間安定に保持されるものであれば、特に制限はなく、液状、固状、粉末状、シラップ状などの何れでもよく、溶液、凍結乾燥品、錠剤、舌下錠、トローチ、粉末、顆粒、クリーム、軟膏、シラップなどの通常の製剤の剤形が、その投与の形態や、製剤の保存や輸送方法などにより適宜選択される。また、本発明のポリペプチド又はそれを含有する組成物は、必要に応じて、リポソームに封入したり、皮膚、組織への浸透促進剤やイオン導入法などを併用することにより、抗原提示細胞の存在部位への浸透を促進させることも、有利に実施できる。また、本発明のポリペプチドは、錠菓、飴、清涼飲料などの各種飲食品に含有せしめ、これを経口的に摂取することにより、ポリペプチドを経粘膜的に摂取させることも随意である。

【0015】

本発明のポリペプチドは、ヒト、イヌ、ネコ、マウスをはじめとする哺乳類、アヒルをはじめとする鳥類、は虫類、魚類とりわけ養殖魚類などの抗体産生を行う動物における病原性のウイルスや細菌などの微生物の感染の予防、治療、破傷風などの毒素に対する耐性、だに、ハウスダスト、花粉などに由来のするアレルギーなどに起因するアレルギーやアトピーなどの各種免疫疾患の予防、治療などの目的で投与されるワクチンとして有利に利用できる。この場合には、本発明のポリペプチドは、口腔内、鼻腔、眼、咽喉、膣内、気管内、腹腔、胸腔、肺胞内、食道内、及び、胃や腸などの消化管内などへの経粘膜的な投与で抗体産生の誘

導が可能であり、皮下、皮内、筋肉内などの通常のワクチンの投与経路での投与にも当然使用できるし、安全性が高いことから、場合によっては、血管内に投与することも可能である。また、本発明のポリペプチドは、任意の蛋白質やポリペプチドに対する特異的な抗体の生産に利用できるだけでなく、それ単独では抗原性のないオリゴペプチドやポリペプチドに対する抗体の生産や、それらに対するモノクローナル抗体産生用の抗原として、前記投与経路での使用に加えて、試験管内での免疫担当細胞の感作にも使用することができる。

【0016】

また、本発明のポリペプチド、及び／又はT細胞エпитープとB細胞エпитープをリンカーを介して結合したポリペプチドなどのように、それ単独を経粘膜投与することにより、生体に抗体産生を誘導できるポリペプチドは、他の抗原と同時に生体に投与することにより、同時に投与された抗原に対する抗体産生を誘導する免疫アジュバントとして使用することができる。その使用量については、同時に投与する他の抗原の抗体産生を誘導できる量であれば、特に制限はないが、可能な限り自己に対する抗体が誘導されない量を投与することが望ましく、その点からは、1回の投与量が約1 μ g以下が特に望ましい。

【0017】

本発明のポリペプチドのヒトを含む動物への投与方法には、特に制限はなく、このポリペプチドが、投与部位へ確実に到達できる方法であれば何れでよい。例えば、スポイトや注射器を使用して適量を粘膜上に滴下してもよく、経口摂取や、クリーム或いはジェル状にして粘膜に塗布したり、カテーテル等で投与部位に誘導してもよく、さらには、ネブライザーなどにより霧状にして吹き付けたり、鼻、気管或いは肺へ吸引させてもよい。皮下、皮内、筋肉内、血管内、腹腔内や胸腔内などの体腔内への投与には、注射器、カテーテル、点滴などの投与方法が使用される。

【0018】

本発明でいう免疫アジュバントとは、免疫機構を非特異的に刺激することによって、抗原に対する特異的免疫反応を強める物質をいう。具体的には、ベントナイト、水酸化アルミニウム、ミョウバン沈殿粒、フロイントのアジュバント、

グラム陰性菌のエンドトキシンなどを挙げるができる。

【0019】

以下、実験例に基づいて本発明のポリペプチドについてより詳細に説明する。

【0020】

【実験例】

生体の感染防御用のワクチンとして利用できるポリペプチドの開発を考慮して、う蝕症の病原体であるストレプトコッカス ミュータンス (*Streptococcus mutans serotype C*) の歯面付着因子の一つである PAc (菌体表層タンパク質抗原) に対する抗体産生系をモデルに使用して、経粘膜的に投与して、効率的に誘導することのできる、ワクチンとしての機能を有するポリペプチドを調製するための実験を以下のようにして行った。また、実験には、PAc 中のアミノ酸配列であって、すでに、遺伝子クローニング、塩基配列、アミノ酸配列、生物活性部位、B細胞エピトープ、T細胞エピトープの解析から、PAc 分子に交叉反応性を持ち、そのう蝕を阻害する活性を有する抗体のみを誘導できる最小単位のペプチド抗原であることが公知の配列表における配列番号 14 記載のアミノ酸アミノ酸配列のペプチド (以下、「ユニットペプチド」という。) を使用した (H. SENPUKUら、*Infection and Immunity*, 63:695-4703 (1995) 参照)。なお、以下の実験で使用したポリペプチドは、全てペプチドシンセサイザー (Advanced Chemtech社製、Model 350 Multiple Peptide Synthesizer) を用いて Fmoc 法にて合成し、TSK-GEL カラム (TOSO, 1X30cm) を使用した逆相 HPLC で精製した純度 95% 以上の標品である。

【0021】

【実験例 1】

<ユニットペプチドに対するマウスの MHC クラス II のハプロタイプの拘束性の解析>

MHC クラス II のハプロタイプのみが異なる 9 種類の B10 コンジェニック マウス (日本 SLC 株式会社販売、雌; 5 週令、一群; 5 匹) のそれぞれに前記

ユニットペプチド ($200 \mu\text{g}/\text{マウス}$) をフロイントの不完全アジュバント (F I A) と共に腹腔免疫し、2週間後に初回免疫と同条件で追加免疫した。その1週間後に採血し、その血清中のユニットペプチド及びP A c に対する抗体価を、ユニットペプチド或いはP A c をコート抗原として使用した、常法のE L I S A 法により測定した。その結果を表1に示す。なお、以下の実験における、各抗原に対する抗体価は、個々のマウスから採血した血液の血清を、それぞれ連続的に2倍希釈した標品中の抗体量を、E L I S A 法により、酵素標識抗体を使用して検出し、分析に使用したマイクロタイタープレートの各ウエルについて、マイクロタイタープレートリーダー (マルチスキャン バイクロマテック、ラボシステム社販売) により、 405 nm の吸光度を測定して、その吸光度と、コート抗原を使用していない対照のウエルの吸光度を比較し、その差が0.1以上となる血清の最高希釈倍率を求め、平均して、抗体価として表した。また、コンジュニクマウスの種類の名称の後に、そのマウスのM H C クラス I I のハプロタイプ の型を「 () 」内に併記した。

【0022】

【表1】

コンジュニクマウスの種類	M H C クラス I I のハプロタイプ	P A c に対する抗体価	ユニットペプチドに対する抗体価
B 1 0 . M	f	19112	35391
B 1 0 . D 2	d	1625	9314
B 1 0 . A	a	1135	9314
B 1 0 . B R	k	1135	4539
B 1 0 . S M	v	138	75
B 1 0 . S	s	138	75
B 1 0 . Y	pa	75	75
B 1 0 . G	q	75	45
B 1 0 . R I I I	r	40	25

【0023】

表1から明らかなように、マウスのM H C クラス I I (H-2) のハプロタイプ

ブが f、d、a、或いは、k 型の B10.M、B10.D2、B10.A、B10.BR の 4 種のコンジュニックマウスでは、他のタイプ MHC クラス II (H-2) のハプロタイプのマウス比較して、ユニットペプチド及び PAc に特異的な抗体の産生が強く誘導された (約 10 倍以上)。このことから、このユニットペプチドには、H-2 のクラス II が a、d、f、k 型の複数のハプロタイプのコンジュニックマウスにおいて、抗 PAc 抗体を誘導するための B 細胞エпитープと、抗原提示に必要な、複数の MHC クラス II のハプロタイプ (H-2 a, d, f, k 型) の拘束を受ける複数の T 細胞エピトープとが、共存していることが明らかになった。また、13 残基の短鎖ペプチドからなるユニットペプチド中に、MHC クラス II (H-2 A) の複数種のハプロタイプに同時に応答できる、マルチアグレートープ型の T 細胞エピトープを有するペプチド抗原が存在することは、1 種類の短いポリペプチドを使用しても、MHC クラス II ハプロタイプの異なる複数の個体に、効率的に抗体産生を誘導できる T 細胞エピトープを有するポリペプチドを、人為的に設計できる可能性を示唆している。

【0024】

【実験例 2】

＜マウスにおけるマルチアグレートープ型 T 細胞エピトープの確認＞

実験例 1 でユニットペプチドに、マルチアグレートープ型の T 細胞エピトープの存在が確認されたため、マウスにおけるマルチアグレートープ型 T 細胞エピトープとして機能するアミノ酸配列とその位置関係を確認するための実験を以下のようにして行った。ユニットペプチドのアミノ酸残基を順次バリンに置き換えたバリン置換ペプチドを合成し、それらを前述のユニットペプチド応答マウスに免疫することにより、抗体誘導に不可欠のアミノ酸残基をそれぞれ推定した。さらに、推定アグレートープに関与する全てのアミノ酸をバリンで同時に置換した位置限定バリン置換ペプチドをそれぞれ合成し、実験例 1 と同様の方法、スケジュールで、各コンジュニックマウスを免疫し、実験例 1 と同様に、血清中の抗体価を ELISA を用いて測定し、その免疫による抗体誘導能の検討から、それぞれの MHC クラス II のハプロタイプに対応するユニットペプチド抗原上のアグレートープを決定した。その結果を表 2 にまとめて示す。なお、表 2 には、各々の MHC ク

ラス I I のハプロタイプで認識されるユニットペプチド上のアミノ酸のみを表記した。

【0025】

【表2】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ユニットペプチドのアミノ酸配列	Thr	Tyr	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	Gln	Tyr	Glu	Aal	Asp	Leu
B10. A (a) のマウスの拘束に関与するアミノ酸				Ala			Lys	Gln			Ala		
B10. D2 (d) のマウスの拘束に関与するアミノ酸			Glu			Leu	Lys					Asp	Leu
B10. M (f) のマウスの拘束に関与するアミノ酸						Leu			Tyr	Glu			Leu
B10. BR (k) のマウスの拘束に関与するアミノ酸	Thr	Tyr			Ala			Gln					

【0026】

表2から明らかなように、それぞれのMHCクラス I I のハプロタイプで認識されるために必要な4又は5個のアミノ酸残基（アグレトープ）が、何れでも、アミノ酸13残基のユニットペプチド分子内に重複およびシフトして共存しており、ユニットペプチド内に、マルチアグレトープ型T細胞エピトープとして、各々のMHCクラス I I のハプロタイプにより認識されるアミノ酸の位置関係が確認された。

【0027】

【実験例3】

＜マルチアグレトープ型ペプチド抗原の人為的構築＞

前記ユニットペプチドのアミノ酸配列に手を加えることにより、人為的にMHCクラス I I ハプロタイプによる拘束に関するマウスの免疫応答を変化させることが可能か否か検討した。実験例2で決定したB10. A (a)、B10. D2 (d) 或いは、B10. M (f) マウスにそれぞれ対応するアグレトープの一部が共存するユニットペプチド分子上の部位（ユニットペプチドのアミノ末端から10～12番）のアミノ酸残基を意図的に他のアミノ酸残基と置換した、配列表における配列番号15（以下、「YQTELペプチド」という。）、配列番号1

6 (以下、「YETDLペプチド」という。)、配列番号17 (以下、「YETALペプチド」という。)、配列番号18 (以下、「YEADLペプチド」という。)) に記載のアミノ酸配列を有するペプチド、ユニットペプチドのカルボキシル末端にリジン-グルタミン-チロシンをさらに結合した、配列表における配列番号19 (以下、「YEADLKQYペプチド」という。)) に記載のアミノ酸配列を有するペプチド、及び、ユニットペプチドのアミノ末端に、B10.S (s) マウスが認識するT細胞エпитープとして公知のPAcのアミノ末端から305~318のアミノ酸配列を有する配列表における配列番号20に記載のアミノ酸配列を有するペプチド (以下、「PAc (305~318)」という。)) を連結して、配列表における配列番号21 (以下、「ユニットペプチド-PAc (305~318)」という。)) 又は22 (以下、「PAc (305~318)-ユニットペプチド」という。)) に記載のアミノ酸配列を有するペプチドを、それぞれ合成して、これらのポリペプチドを、実験例1と同様の、免疫方法、スケジュールで一連のB10コンジェニックマウスに免疫し、追加免疫の2週間後に、各マウスから採血し、これから血清を分離後、生理食塩水で512倍に希釈して、実験例1と同様のELISA法で測定し、免疫に使用した各々のポリペプチドに対する各々のコンジェニックマウスにおける抗体産生の誘導程度を、405nmの吸光度で比較した。その結果を表3に示す。また、ユニットペプチド-PAc (305~318) 或いはPAc (305~318)-ユニットペプチドで免疫したマウスの血清中のユニットペプチドに特異的な抗体量の測定結果を表4に示す。なお、吸光度が、0.1以上の場合には、希釈した血清中に、ユニットペプチドに対する抗体が存在すると判定した。

【0028】

【表3】

コンジェニックマウスの種類	MHCクラスIIのハプロタイプ	ユニットペプチドに対する抗体価 (405nm吸光度)					
		YQTELペプチドで免疫	YETDLペプチドで免疫	YETALペプチドで免疫	YEADLペプチドで免疫	YQADLKQYペプチドで免疫	PAC (305-318)-ユニットペプチドで免疫
B10. A	a	0.01	0.01	0.01	0.28	0.29	0.29
B10. D2	d	0.01	0.32	0.32	0.33	0.32	0.30
B10. M	f	0.01	0.12	0.33	0.32	0.32	0.32
B10. BR	k	0.22	0.31	0.30	0.30	0.30	0.30
B10. S	s	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.31
B10. SM	v	0.01	0.01	0.01	0.01	0.32	0.31

【0029】

【表4】

コンジェニックマウスの種類	MHCクラスIIのハプロタイプ	ユニットペプチドに対する抗体価	
		ユニットペプチド-PAC (305-318)で免疫	PAC (305-318)-ユニットペプチドで免疫
B10. D2	d	7610	28695
B10. S	s	106	108205
B10. A	a	13727	51761
B10. M	f	59986	108205

【0030】

表3から明らかなように、ユニットペプチドのアミノ酸を意図的にデザインすることにより、YQTELペプチドで免疫した場合には、B10. BR (k) 1種類のみ抗体産生が誘導されたのに対して、YEADLペプチド（ユニットペプチド）で免疫した場合には、B10. S (s) 及びB10. SM (v)を除く4種のマウスに同時に抗体の産生が誘導された。このことから、ペプチド中の1～3個のアミノ酸の種類を変えることにより、異なるMHCクラスIIのハプロタイプを有する個体において、そのユニットペプチドに対する免疫応答性を変化させることができることが確認された。また、YEADLKQYペプチドのように、ユニットペプチドのカルボキシル末端にリジン-グルタミン-チロシンを附加することにより、MHCクラスIIのハプロタイプの型の異なる、B10

． S (s) を除く 5 種類のマウスで抗体の産生が誘導された。さらに、表 3 及び表 4 から明らかなように、P A c (305～318) - ユニットペプチドのように、ユニットペプチドのアミノ末端に、このユニットペプチドに不応答マウスである B10. S (s) が応答することが知られている T 細胞エпитープである P A c (305～318) ペプチドを連結することにより s 型を含む 6 種類の M H C クラス I I 型を有する個体で、同時にユニットペプチドに対する抗体が誘導できるマルチアグレトープ型ペプチド抗原となることが確認された。これらのことから、抗原上の複数の M H C クラス I I のハプロタイプによる拘束性に関与するアミノ酸配列の解析を行い、その結果に基づき、個々の M H C クラス I I のハプロタイプの拘束を受けるアミノ酸配列を重複させたアミノ酸配列を有するペプチドを人為的にデザインすることにより、抗原に対する抗体産生を効率的に誘導でき、複数の M H C クラス I I のハプロタイプの拘束を同時に受けることができる重複型のマルチアグレトープ型 T 細胞エпитープの構築が可能であることが確認された。また、複数の T 細胞エпитープをタンデムに結合することにより調製したクラスター型 T 細胞エпитープも、重複型エпитープと同様に、複数の M H C クラス I I のハプロタイプの拘束を受ける個体に対する、抗体産生を効率よく誘導する T 細胞エпитープとなることが確認された。また、表 4 から明らかなように、P A c (305～318) とユニットペプチドを連結したポリペプチドで免疫したマウスにおける、ユニットペプチドに対する抗体の産生は、免疫に使用したポリペプチドのカルボキシル末端側にユニットペプチドを連結した場合の方が、アミノ末端側に連結したものよりも、抗体産生の増強が強い傾向が認められた。

【0031】

【実験例 4】

＜ヒト用マルチアグレトープ型ペプチド抗原の人為的構築＞

上記実験例 3 の結果に鑑み、M H C クラス I I ハプロタイプの拘束に起因するヒトによる免疫原性の強弱の解決策として、公知のヒトの M H C クラス I I ハプロタイプ (H L A - D R) 拘束に対する T 細胞エпитープの拘束モチーフ (アグレトープ配置) に基づき、配列表における配列番号 23 に記載のアミノ酸配列を

有する、複数のMHCクラスIIのハプロタイプの拘束に対して同時に応答可能な重複・シフト型のマルチアグレトープ型ペプチド (Overlapping Multiagretope Peptide: 以下の実験では、このペプチドを「OMP」と略記する。) を構築した。なお、具体的なデータは示さないが、このポリペプチドは、マウスにおいても、T細胞のマルチアグレトープとしての機能を有することが確認された。なお、表5として、ヒトのMHCクラスIIであるHLA-DRの各々のハプロタイプにより認識されるOMP上のアミノ酸のみを示した。

【0032】

【表5】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OMPのアミノ酸配列	Leu	Ala	Val	Tyr	Trp	Glu	Leu	Leu	Ala	Lys	Tyr	Leu	Leu	Asp	Arg	Val	Gln	Lys	Val	Ala
HLA-DR1の拘束に関与するアミノ酸				Tyr			Leu		Ala			Leu								
HLA-DR3の拘束に関与するアミノ酸			Val			Glu														
HLA-DR4の拘束に関与するアミノ酸											Tyr			Asp		Val	Gln			
HLA-DR5の拘束に関与するアミノ酸													Leu		Arg	Val		Lys		
HLA-DR6の拘束に関与するアミノ酸													Leu		Arg	Val		Lys		Ala
HLA-DR7の拘束に関与するアミノ酸				Tyr			Leu					Leu								
HLA-DR8の拘束に関与するアミノ酸													Leu			Val		Lys		
HLA-DR-11の拘束に関与するアミノ酸					Trp			Leu		Lys										

【0033】

【実験例5】

<ポリペプチドの特異抗体産生の増強に及ぼすリンカーペプチドの影響>

実験例3で調製した短鎖のユニットペプチドでは免疫原性が弱く、その免疫原性の増強のために、ポリペプチドをタンデムに連結することを検討したものの、このままでは、連結により生じた新たなエピトープに対する抗体産生も増強されることを考慮し、B細胞エピトープが正確に提示されることを目的として、T細胞エピトープを含むポリペプチドとB細胞エピトープを含むポリペプチドの間に

、抗原提示細胞で抗原のプロセッシングに関与するエンドソーム内プロテアーゼ（カテプシンB）の認識配列であるKKをリンカーペプチドとして挿入し、その抗体産生の増強に対する影響を確認する実験を以下のように行った。実験例4で調製したOMPはマウスのT細胞エпитープのアミノ酸配列も含んでいることから、このOMPと、B細胞エпитープを含むペプチドとなるユニットペプチドとの間に、KKのアミノ酸を挿入した、配列表における配列番号24（以下、「OMP-KK-ユニットペプチド」と略記する。）、及び、配列番号25（以下、「ユニットペプチドKK-OMP」と略記する。）記載のアミノ酸配列からなる2種類のポリペプチドを合成し、実験例1と同様の方法により、BALB/cマウスの腹腔内に免疫し、実験例1と同様に、ELISAにより、その血清中の、OMP、免役したポリペプチド、及び、PAcに対する抗体価を測定した。その結果を表6に示す。

【0034】

【表6】

抗原として使用したポリペプチド	PAcに対する抗体価	免疫したペプチドに対する抗体価	OMPに対する抗体価
OMP-KK-ユニットペプチド	836462	782685	1737
ユニットペプチド-KK-OMP	961	29921	1211

【0035】

表6から明らかなように、リンカーペプチドのKKを挟んでT細胞エпитープであるOMPをポリペプチドのアミノ末端側に、B細胞エпитープであるユニットペプチドをカルボキシル末端側に位置させることにより、効率良い抗体の誘導が認められた。また、この傾向は、実験例3でもマウスの系統にかかわらず同様であり、とりわけ、ユニットペプチドのアミノ酸配列にはT細胞エпитープが存在せず、PAc（305～318）のアミノ酸配列にのみにT細胞エпитープが存在するB10.S(s)においては顕著であった（表4参照）。以上から、リンカーペプチドを挟んでアミノ末側のペプチドがT細胞エпитープとして、またカルボキシル末側のペプチドがB細胞エпитープとしてより効果的に認識されることが明らかとなった。

【0036】

【実験例6】

＜細胞接着分子の細胞結合モチーフ附加によるペプチド抗原の鼻腔免疫における免疫原性の増強＞

抗う蝕活性を有する配列表における配列番号26記載のアミノ酸アミノ酸配列を有するユニットペプチドーKKーユニットペプチドで構成されるポリペプチド（以下、「ジユニットペプチド」という。）は、注射（皮下或いは腹腔）による免疫においては免疫アジュバントを必要とせずに目的抗体を誘導できるが、経鼻免疫においては免疫アジュバント無しでは十分な抗体誘導能を示さない。そこで、このジユニットペプチドの経鼻免疫における抗原性を増強するために、このペプチドを粘膜面に長くとどめておくことを目的として、インテグリンファミリー等を介しての細胞接着性が証明されているタンパク質（フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン等）のインテグリン結合モチーフや他の細胞接着モチーフのアミノ酸配列を当該ペプチドのアミノ末に附加することによる免疫原性に対する影響を確認するための実験を以下のように行った。すなわち、前記ジユニットペプチドの、アミノ末端に、細胞接着アミノ酸配列としてRGD、RED、LDV、PHSRN、KKK、DGEA及びYIGSR、IKVAV、IRVVM、及びRFYVVMWKから選ばれる何れか1種又は2種を連結したポリペプチドを合成した。また、対照として、ジユニットペプチドのみ、及び、このポリペプチドに、単独では細胞接着能が無いとされているカドヘリン関連の配列表における配列番号27（以下、「DRE」と略記する。）、配列番号28（以下、「DED」と略記する。）配列番号29（以下、「HAV」と略記する。）に記載のアミノ酸配列を有するペプチドを連結したポリペプチドを合成した。一群5匹のBALB/cマウス（日本SLC株式会社、雌、5週令）に、リン酸緩衝生理食塩水（以下、「PBS」と略記する。）または蒸留水に $50\mu\text{g}/4\mu\text{l}$ の濃度で無菌的に溶解した各種ポリペプチド溶液を、片鼻 $2\mu\text{l}$ 、計 $4\mu\text{l}$ （ $50\mu\text{g}/\text{個体}/\text{回}$ ）、鼻腔から滴下により吸入させた。なお、さらに、対照として、ジユニットペプチドからなるポリペプチドのみを経鼻投与した群、及び、このポリペプチドと共にCT $1\mu\text{g}$ を投与した群を設定した。また、ユニットペプチドーKK

ーユニットペプチド及びこれにRGDを連結したポリペプチドは、腹腔内投与も行った。初回免疫の2週間後に、追加免疫として、各々初回と同種類、同量のポリペプチドを同条件下に経鼻的に投与した。さらに、その2週間後に、各々前回と同一種類、同一量のポリペプチドを同条件下で投与し、その一週後、マウスの血清中の、PAc、ジユニットペプチド、CT、ジユニットペプチドに細胞接着アミノ酸配列を附加したポリペプチドの各々に対する抗体価を、実験例1と同様のELISA法によりそれぞれ測定した。また、RGD或いはYIGSRを附加したポリペプチドについては、これらのペプチドが、抗体産生の増強に関与していることを確認するために、その阻害剤として知られている、配列表における配列番号30（以下、「RGDS」と略記する。）或いはYIGSRを同時に添加して、同様に免疫を行った。その結果を表7に示す。なお、RGD、RED、LDV、PHSRN、RKK、DGEA及びYIGSR、IKVAV、IRVVM、及びRFYVVMWKから選ばれる何れか1種又は2種以上を附加したジユニットペプチドで免疫したマウスでは、何れも、ユニットペプチドに対する抗体の産生が増強され、DRE、DED、或いは、HAV附加したジユニットペプチドで免疫したマウスでは何れも、ユニットペプチドに対する抗体の産生が増強されなかった。表7では、ジユニットペプチド、配列表における配列番号31（以下、「RGD-ジユニットペプチド」という。）、配列番号32（以下、「RED-ジユニットペプチド」という。）、配列番号33（以下、「YIGSR-ジユニットペプチド」という。）、配列番号34（以下、「DED-ジユニットペプチド」という。）、配列番号35（以下、「HAV-ジユニットペプチド」という。）に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドで免疫した結果のみを示す。

【0037】

【表 7】

抗原として使用したポリペプチド	投与経路	PACに対する抗体価
ジュニットペプチド	経鼻投与	640
CT + ジュニットペプチド		32768
RGD-ジュニットペプチド		5069
RGDS + RGD-ジュニットペプチド		256
RED-ジュニットペプチド		1395
YIGSR-ジュニットペプチド		1195
YIGSR + YIGSR-ジュニットペプチド		235
DED-ジュニットペプチド		544
HAV-ジュニットペプチド		320
ジュニットペプチド	腹腔内投与	312
RGD-ジュニットペプチド		2352

【0038】

表7から明らかなように、ジュニットペプチドを単独で経鼻投与したのでは、ほとんどジュニットペプチドに対する抗体産生の誘導が認められないのに対して、インテグリン結合モチーフのRGD、RED、或いは、ラミニン結合タンパク質に対するラミニン分子上の結合モチーフのYIGSRを附加したRGD-ジュニットペプチド、RED-ジュニットペプチド、或いは、YIGSR-ジュニットペプチドを経鼻投与した場合には、CTと同時にジュニットペプチドを経鼻投与した場合と同等の強力な抗体産生の増強効果が認められた。なお、その際に、RGDSやYIGSRの短鎖ペプチドを共存させた場合には、PACに特異的な抗体の産生が抑制されたことから、RGDやYIGSRなどの細胞接着分子のモチーフの附加が、ポリペプチドのもつ抗体産生の誘導能を、さらに増強する効果があることが示唆される。

【0039】

【実験例 7】

＜経粘膜投与ペプチドワクチンの抗体産生増強に対する細胞接着分子の影響＞
 実験例6のジュニットペプチドで証明されたインテグリン結合モチーフの附加の及ぼす、他のペプチド抗原による抗体産生の増強への影響、及び、インテグリン

結合モチーフの附加部位の違いによる抗体産生増強への影響を調べる実験を、以下のように行った。実験例 5 で P A c に対する特異抗体の産生増強能の高いことが確認された、OMP-KK-ユニットペプチドの OMP、或いは、ユニットペプチドのアミノ末端側又はカルボキシル末端側に、実験例 6 で、ポリペプチドの抗体産生の誘導の増強作用が示唆された細胞接着分子のインテグリン結合モチーフとして知られている R G D を、挿入した、配列表における配列番号 36 (以下、「R G D-OMP-KK-ユニットペプチド」と略記する。)、配列番号 37 (以下、「OMP-R G D-KK-ユニットペプチド」と略記する。)、配列番号 38 (以下、「OMP-KK-R G D-ユニットペプチド」と略記する。)、配列番号 39 (以下、「OMP-KK-ユニットペプチド-R G D」と略記する。) のアミノ酸配列を有する 4 種類のポリペプチドを合成した)。なお、陽性対照として、経粘膜投与でアジュバント活性を有することが既に知られているコレラトキシンを使用した。これらのポリペプチド或いはポリペプチドとコレラトキシンの混合液を使用して、実験例 6 と同じ方法により、B 10 マウスを免疫して、その抗体産生の増強を誘導する効果の有無を判定した。その結果を表 8 に示す。

【0040】

【表 8】

抗原として使用したポリペプチド	P A c に対する抗体価	免疫したペプチドに対する抗体価	OMP に対する抗体価
OMP-KK-ユニットペプチド	32	128	32
CT+OMP-KK-ユニットペプチド	1454	1063	14
R G D-OMP-KK-ユニットペプチド	11544	11514	32
OMP-R G D-KK-ユニットペプチド	26241	24370	16
OMP-KK-R G D-ユニットペプチド	169	723	16
OMP-KK-ユニットペプチド-R G D	1981	9483	16

【0041】

表 8 から明らかなように、OMP-KK-ユニットペプチドに R G D を挿入すると挿入部位の如何に関わらず、P A c に対する抗体産生が強く増強され、その

増強の誘導能は、コレラトキシンの同時投与に匹敵するものであった。また、特に、細胞接着分子のモチーフをOMPに隣接する形で、OMPのアミノ末端側或いはカルボキシル末端側に挿入した場合に、言い換えれば、リンカーを挟んでN末端側に挿入した場合に目的とする抗体の産生がより強く増強され、かつ、誘導される抗体のほとんどがP A cと反応する抗体であることが確認された。これらのことから、アジュバント非存在下における経鼻免疫においてもリンカーを挟んでアミノ末側のペプチドがT細胞エピトープとして、またカルボキシル末側のペプチドがB細胞エピトープとしてより効果的に認識され、目的とするB細胞エピトープに特異的な抗体産生を効率的に増強し、しかも、リンカーを挟んでアミノ末端側にR G D配列を附加することにより、R G Dの附加により新たに生ずるエピトープを認識する目的外の抗体（ペプチドと反応するがP A cとは反応しない）の誘導が著しく抑制できることを明らかとなった。

【0042】

【実験例8】

＜経粘膜投与ペプチドワクチンの基本デザインの普遍性＞

実験例7で調製したR G D-T細胞エピトープ-K K-B細胞エピトープで構成されたポリペプチドのT細胞エピトープとB細胞エピトープの何れか一方を、OMP或いはユニットペプチド以外のポリペプチドで置き換えた場合の、B細胞エピトープに対する抗体産生の増強への影響を調べる実験を以下のように行った。T細胞エピトープとして、種を問わず幅広いM H CクラスI Iハプロタイプの拘束性がすでに報告されている、配列表における配列番号40記載のH I V I I B g p 120由来のマルチアグレトープ型T細胞エピトープであるT1ペプチド（P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A ; 94, 10856, (1997) 参照。）（以下、「T1」と略記する。）を使用し、B細胞エピトープとしてB A L B / c マウスにおいて卵白アルブミン（以下、「O V A」と略記する。）に対する抗体を誘導することが知られている、配列表における配列番号41記載のアミノ酸配列からなるO V A由来の14残基のペプチド（以下、「O V A p」と略記する）（S c i e n c e, 256:1817 (1992) 参照。）を使用して、配列表における配列番号42（以下、「R G D-O M P-K

K-OVA_p」と略記する。)、或いは、配列表における配列番号43(以下、「T1-RGD-KK-ユニットペプチド」と略記する。)記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを合成した。また、対照として、配列表における配列番号44(以下、「OMP-KK-OVA_p」と略記する。)、このポリペプチドにCTを加えたもの、配列表における配列番号45(以下、「T1-KK-ユニットペプチド」と略記する。)、このポリペプチドにCTを調製し、これらのポリペプチドを、各々、実験例6と同様の方法で、BALB/cマウスに鼻腔免疫を行った。その結果を表9に示す。

【0043】

【表9】

抗原として使用したポリペプチド	OMPに対する抗体価	免疫したペプチドに対する抗体価	OVAに対する抗体価	CTに対する抗体価
OMP-KK-OVA _p	108	1589	1656	測定せず
RGD-OMP-OVA _p	235	5080	11692	
CT + OMP-KK-OVA _p	7319	21310	25654	3656835
	T1に対する抗体価		PAcに対する抗体価	
T1-KK-ユニットペプチド	103	160	320	測定せず
T1-RGD-KK-ユニットペプチド	107	1707	1579	
CT + T1-KK-ユニットペプチド	69	1152	176	139264

【0044】

表9から明らかなように、RGD-OMP-KK-OVA_p、或いは、T1-RGD-KK-ユニットペプチドのアミノ酸配列からなるポリペプチドで、経鼻免疫したマウスでは、OVA或いはPAc特異的な抗体の産生が増強された。すなわち、RGDを附加したポリペプチドで免疫した場合には、RGDを附加していないポリペプチドで免疫した場合よりも強い抗体産生の増強が認められ、その増強の程度は、RGDを附加附加していないポリペプチドにCTを加えて免疫した場合と、ほぼ同等であった。しかも、CTを加えた場合には、OMPに対する抗体産生の増強が認められたり、ユニットペプチドに対する抗体産生は増強されていても、PAcと反応する抗体の産生が低いことが確認された。

【0045】

【実験例 9】

＜経粘膜投与用ポリペプチド以外の抗原を経粘膜投与した際の抗体産生の増強に及ぼす経粘膜投与用ポリペプチドの影響＞

前記実験例や非特許文献 1 に開示されているように、CT は抗原性が強く、経鼻的に投与すると、CT に対する抗体が誘導されるだけでなく、CT と同時に経粘膜投与した、CT 以外の抗原に対する抗体産生を増強することが知られている。一方、実験例 7 及び実験例 8 から明らかなように、RGD-OMP-KK-ユニットペプチド、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、RGD-OMP-KK-OVA_p 或いは T1-RGD-KK-ユニットペプチドのアミノ酸配列からなるポリペプチドは、CT と同様に、それらの単独の経鼻投与で、それぞれのポリペプチドに特異的な抗体の産生が誘導されたことから、このポリペプチドに CT で認められる、他の抗原の抗体産生増強に及ぼす影響を確認するための実験を以下のように行った。

＜牛血清アルブミンの経鼻投与に及ぼす各種ポリペプチド影響＞

牛血清アルブミン（以下、「BSA」と略記する。）4 μ g と、ジユニットペプチド 1 μ g、RGD-ユニットペプチド-KK-ユニットペプチド 1 μ g、OMP-KK-ユニットペプチド 1 μ g、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド 1 μ g、OMP-KK-OVA_p 1 μ g、RGD-OMP-KK-OVA_p 1 μ g 或いは CT 2 μ g の何れか 1 種を混合した生理食塩水溶液を調製し、各々、実験例 6 と同様の方法で、BALB/c マウスに鼻腔免疫を行い、血中の抗体価を測定した。その結果を表 10 に示す。なお、測定は、BSA、BSA と共に投与したペプチド、及び、CT に対する抗体について行った。

＜卵白アルブミンの経鼻投与に及ぼす各種ポリペプチド影響＞

OVA 4 μ g と OMP-RGD-KK-ユニットペプチド 1 μ g、OMP-RGD-KK-OVA_p 1 μ g 或いは CT 2 μ g の何れか 1 種を混合した生理食塩水溶液を調製し、各々、実験例 6 と同様の方法で、B10.D2 マウス或いは BALB/c マウスに鼻腔免疫を行い、血中の抗体価を測定した。その結果を表 10 に示す。なお、測定は、OVA、OMP-RGD-KK-OVA_p、及び、CT に対する抗体について行った。

【0046】

【表10】

抗原として使用したポリペプチド	CTに対する抗体価	BSAに対する抗体価	免疫したペプチドに対する抗体価
BSA	測定せず	32	測定せず
CT + BSA	1887437	838861	
ジユニットペプチド + BSA	測定せず	179	83
RGD-ジユニットペプチド + BSA		6912	154
RGDS + RGD-ジユニットペプチド + BSA		576	128
OMP-KK-ユニットペプチド + BSA		20480	1152
OMP-RGD-KK-ユニットペプチド + BSA		109227	213
OMP-KK-OVA _p + BSA		1441792	224
RGD-OMP-KK-OVA _p + BSA		1527887	256
		OVAに対する抗体価	
OVA		203	測定せず
CT + OVA	681574	24576	
OMP-RGD-KK-ユニットペプチド + OVA	測定せず	10242	24
OVA		16	測定せず
CT + OVA	524288	4096	
OMP-RGD-KK-ユニットペプチド + OVA	測定せず	2176	26

【0047】

表10から明らかなように、BSA或いはOVAを単独で経鼻投与しても、液中には、これらのポリペプチドに対する抗体はほとんど誘導されなかった。これに対して、BSA又はOVAと、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVA_p又はRGD-OMP-KK-OVA_pの何れか1種とを同時に投与したマウスでは、BSA或いはOVAに対する強い抗体の産生が誘導された。また、BSAとRGD-ユニットペプチド-KK-ユニットペプチド又はOMP-KK-ユニットペプチドとを同時に投与した場合にも、BSA又はOVAに対する抗体の産生が誘導されももの、増強の程度は、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVA_p又はRGD-OMP-KK-O

VApと同時に投与した場合よりも低かった。BSA又はOVAと、CTとを投与した場合にも、BSA又はOVAと、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVAp又はRGD-OMP-KK-OVApの何れか1種を同時に投与した場合と同程度の抗体産生が認められた。しかしながら、実験に使用した1 μ gのOMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVAp或いはRGD-OMP-KK-OVApの何れかを同時に投与した場合には、これらのペプチドに対する抗体の産生は、わずかであったのに対して、2 μ gコレラトキシンを同時に投与した場合には、CTに対する抗体も強く誘導された。これらのことから、OMP-RGD-KK-ユニットペプチド、OMP-KK-OVAp或いはRGD-OMP-KK-OVApは、自己に対する抗体産生を誘導する量以下の量を、他の抗原と同時経鼻投与することにより、同時に投与した自己以外の抗原の抗体産生を誘導する免疫アジュバントとして使用できることが確認された。

【0048】

以上の実験結果から、種々のT細胞エпитープと種々のB細胞エпитープを組み併せて、その間にKKなどのプロテアーゼの認識配列をリンカーペプチドとして挿入し、さらに、このペプチドに細胞接着分子のモチーフを附加したポリペプチドは、B細胞エпитープ或いはそれを含む抗原に対する抗体の産生を増強することのできることが明らかとなった。また、これらのポリペプチドは、経鼻のような経粘膜投与でも免疫アジュバントを併用することなしに、投与したポリペプチドの中のB細胞エпитープに対する抗体を、効率よく誘導でき、しかも、それ以外の部位に対する不要な抗体の産生がほとんどないため、特異的な抗体産生の誘導剤、或いは、抗体産生の増強剤として使用できることが確認された。また、これらのポリペプチドを投与された生体では、免疫に使用したB細胞エпитープを含むホールの抗原を認識する抗体が効率よく産生されることから、本発明のポリペプチドは、経鼻免疫をはじめとする経粘膜免疫において、免疫アジュバントを必要とせずに、目的とする感染防御抗体や毒素、酵素類の活性の中和抗体やアレルギーに対する抗体などの種々の抗原に対する抗体の誘導が可能であることを示しており、しかも、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束された個体に

、抗体産生を効率的に誘導できることから、感染防御などの目的で使用する、経鼻粘膜免疫用ペプチドワクチンとして使用できることが示された。また、これらポリペプチドは、他の抗原と同時に粘膜免疫されたとき、免疫アジュバントとして機能することも明かとなった。

【0049】

以下に、実施例で、本発明のポリペプチドについて具体的に説明する。しかし、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0050】

【実施例1】

＜P A c に対する抗体の産生の増強用の組成物＞

実験例7の方法に準じて調製した、RGD-OMP-KK-ユニットペプチド、RGD-OMP-KK-ユニットペプチド、RGD-OMP-KK-ユニットペプチド及びOMP-KK-ユニットペプチド-RGDの何れか1種を100 μ g/mlと α 、 α -トレハロース（試薬級 株式会社林原生物化学研究所販売）を40%となるように、蒸留水に溶解し、常法により滅菌してシラップ剤を得た。これを滅菌バイアル瓶に2mlずつ分注し、密閉して、ポリペプチド含有シラップ剤を調製した。本品は、安定性に優れ、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されたヒトや動物に、経鼻、或いは、経口的に投与することにより、う蝕予防活性を有する抗体産生を効率的に増強するワクチン効果を発揮することができる。また、本品は、経粘膜や経皮などの投与により、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

【0051】

【実施例2】

＜P A c に対する抗体の産生の増強用の組成物＞

安定剤として、1% (w/v) のショ糖を含む生理食塩水に、実験例7の方法に準じて調製したRGD-T1-KK-ユニットペプチドを、各々10 μ g/ml、100 μ g/ml、又は、1000 μ g/mlとなるように溶解し、ろ過滅菌した。これを滅菌バイアル瓶に1mlずつ分注し、常法により、凍結乾燥して

、密閉し、ポリペプチド含有製剤を調製した。本品は、安定性に優れた、う蝕予防効果に優れた、経粘膜摂取或いは注射用の製剤である。本品は、何れも、注射用蒸留水 1 ml に完全に溶解して使用する。また、本品は、何れも、安定性に優れ、広範な MHC クラス II のハプロタイプに拘束されたヒトや動物に、経鼻、或いは、経口的に投与することにより、う蝕予防活性を有する抗体産生を効率的に増強するワクチン効果を発揮することができる。また、本品は、経粘膜や経皮などの投与により、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

【0052】

【実施例 3】

<ポリペプチド含有組成物の毒性試験>

実施例 1 或いは、実施例 2 で調製したポリペプチドを 12.5 mg/ml となるように、0.5% のショ糖を含有する生理食塩水で希釈し、これを、生後 5 週令の DDDY 系の雄マウスに、常法により経口、腹腔内又は、筋肉内に投与して、LD50 を検討した。これらの標品は何れも、LD50 がポリペプチド質量に換算して 100 mg/kg マウス体重以上であり、このことは、本発明のポリペプチドが、ヒトや動物に投与しても、毒性のない、安全な製剤であることを示している。

【0053】

【実施例 4】

<HIV に対する抗体産生の増強用の組成物>

T 細胞エピトープとして OMP、T1、HLA-DR1、2、3、4、5、6、7、8、9、51、52、53 に結合することが報告されている、配列表における配列番号 46 記載の HIV-1 由来の gag 298-312 ペプチドと相同のアミノ酸配列を有するペプチド、又は、配列表における配列番号 47 記載の HIV-1 由来の pol 596-610 (Wilson, C. C. ら、Journal of Virology. 75, 4195-4207 (2001) 参照。) と相同のアミノ酸配列を有するペプチドから選ばれる何れか 1 つを用い、RGD をそのアミノ又はカルボキシル末端に配し、KK からなるリンカーペプチドを

はさんでカルボキシル末端側にHIV中和抗体を誘導するためのB細胞エピトープとして、配列表における配列番号48に記載のアミノ酸配列からなるHIVのgp120蛋白のV3のloopペプチドと相同のペプチド(Haynes, B. F. ら、The Journal of Immunology 151, 1646-1653 (1993) 参照。)を配したポリペプチドを調製した。これらのペプチドから選ばれる何れか1種又は2種を各々150 μ g/mlとマンニトール100mg/ml含有する生理食塩水溶液を調製した。これらを、5ml容のバイアル瓶に1ml/バイアルとなるように分注し、常法により凍結乾燥した。本品は、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されたヒトに経粘膜や経皮などの投与により、HIVに特異的な抗体の産生を効率よく増強することができることから、HIV感染の広がり、或いは、HIV感染者の発症を遅延させるワクチンの目的で有利に使用できる。また、本品は、経粘膜投与などにより、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

【0054】

【実施例5】

＜インフルエンザウイルスに対する抗体の産生増強用の組成物＞

T細胞エピトープとしてOMP、T1、配列表における配列番号47及び配列番号48記載のアミノ酸配列を有するペプチドから選ばれる何れか1つを用い、RGD或いはYIGSRをそのアミノ又はカルボキシル末端に配し、KKリンカーペプチドをはさんでカルボキシル末端側にインフルエンザウイルスの中和抗体を誘導するためのB細胞エピトープとして、配列表の配列番号49記載のインフルエンザウイルスのヘムアグルチニン(HA)蛋白アミノ末端からの91~108番目のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するペプチド(Ben-Yedidia, T. ら、Molecular Immunology. 39, 323-331 (2002) 参照。)を配したペプチドワクチンを、常法により合成した。これらのポリペプチドから選ばれる何れか1種又は2種を各々75 μ g/mlとヒトアルブミン0.5mg/ml含有する生理食塩水溶液を調製した。これらを、5ml容のバイアル瓶に1ml/バイアルとなるように分注し、常法によ

り凍結乾燥した。本品は、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されたヒトや鳥類やその他の動物に経粘膜や経皮などで投与することにより、インフルエンザウイルスに特異的な抗体の産生を効率よく増強することができるワクチン効果を有することから、インフルエンザウイルスの感染を防御することができる。また、本品は、経粘膜投与などにより、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

【0055】

【実施例6】

<パピローマウイルスワクチン>

T細胞エピトープとしてOMP、T1、配列表における配列番号47及び配列番号48記載のアミノ酸配列を有するペプチドから選ばれる何れか1つを用い、RGDをそのアミノ末端又はカルボキシル末端に配し、KKリンカーペプチドをはさんでカルボキシル末端側にヒトパピローマウイルスの中和抗体を誘導するためのB細胞エピトープとして、配列表における配列番号50記載のL2：蛋白由来の部分アミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するペプチド(Kawana, K.ら、Vaccine. 19, 1496-1502 (2001) 参照。)を配したポリペプチドワクチンを調製した。これらのペプチドから選ばれる何れか1種又は2種を各々200 μ g/mlとゼラチンを0.25mg/ml含有するリン酸緩衝生理食塩水溶液を調製した。これらを、5ml容のバイアル瓶に0.5ml/バイアルとなるように分注し、常法により凍結乾燥した。本品は、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されたヒトに粘膜投与や経皮投与などにより、パピローマウイルスに特異的な抗体の産生を効率よく増強することから、ヒトパピローマウイルスの感染を防御できる。また、本品は、経鼻投与などの経粘膜により、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

【0056】

【実施例7】

実験例8の方法で調製した、RGD-OMP-KK-OVApのアミノ酸配列を有するポリペプチドを100 μ g/mlと α , α -トレハロース(試薬級 株

式会社林原生物化学研究所販売)を40%となるように、蒸留水に溶解し、常法により滅菌してシラップ状物を得た。これを滅菌バイアル瓶に2mlずつ分注し、密閉して、ペプチドワクチン含有シラップを調製した。本品は、安定性に優れ、動物に、経鼻、或いは、経口的、経皮的などに投与することにより、OVAに対する抗体を効率的に増強することができる。また、本品は、経鼻投与などにより、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとしても有利に利用できる。

【0057】

<インフルエンザワクチンの抗体産生増強用の組成物>

生理食塩水1mlあたり、市販のインフルエンザHAワクチン(藤沢薬品工業株式会社販売)4 μ gとRGD-OMP-KK-OVA_p又はRGD-OMP-KK-ユニットペプチド1 μ 、とを含有する標品を調製した。これを、滅菌バイアル瓶に0.5mlずつ分注して、密閉した。本品は、RGD-OMP-KK-OVA_p又はRGD-OMP-KK-ユニットペプチドのもつ免疫アジュバント作用により、そのままでは、経粘膜投与しても抗体産生を誘導することのできないインフルエンザワクチンの経鼻などの経粘膜投与による抗体産生を増強するので、本品を、2週おきに3回ないし4回鼻腔に投与することにより、インフルエンザの感染を防御する抗体の産生を増強することができるワクチンとして使用することができる。

【0058】

【発明の効果】

以上説明したとおり、本発明は、特定の抗原ペプチドを含み、目的とする抗原エピトープに対する特異的な抗体の産生を、免疫アジュバント非存在下においても特異的に増強するポリペプチド及其のポリペプチドを含有する組成物に関するものである。しかも、本発明のポリペプチドは、免疫アジュバントを用いる必要もなく、また、経鼻投与や経口投与などの経粘膜投与で利用できることから、注射による経皮投与などに比して、簡易かつ安全な、広範なMHCクラスIIのハプロタイプに拘束されたヒトを含む哺乳動物や鳥類、は虫類、魚類などの抗体産生を行う動物用のワクチン或いは特異抗体産生の増強用の抗原として使用するこ

とができる。また、本発明のポリペプチドは、これとともに投与した、他の抗原の抗体産生を増強する免疫アジュバントとして使用することもできる。

【 0 0 5 9 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Polypeptide

<160> 50

<210> 1

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Lys Lys

1

<210> 2

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Lys Arg

1

<210> 3

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 3

Arg Arg

1

<210> 4

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 4

Arg Gly Asp

1

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 5

Arg Glu Asp

1

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 6

Leu Asp Val

1

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 7

Pro His Ser Arg Asn

1

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Arg Lys Lys

1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9

Asp Gly Glu Ala

1

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 10

Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 11

Ile Lys Val Ala Val

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 12

Arg Phe Tyr Val Val Met Trp Lys

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 13

Ile Arg Val Val Met

1 5

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 14

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

1

5

10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 15

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Gln Thr Glu Leu

1

5

10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 16

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Thr Asp Leu

1

5

10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 17

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Thr Ala Leu

1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 18

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

1 5 10

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 19

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Lys Gln Tyr

1 5 10 15

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 20

Asn Glu Ala Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Ala Tyr Gln Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 21

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Asn Glu Ala

1 5 10 15

Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Ala Tyr Gln Thr

20 25

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 22

Asn Glu Ala Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Ala Tyr Gln Thr Thr Tyr

1 5 10 15

Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

20 25

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 23

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val

1 5 10 15

Gln Lys Val Ala

20

<210> 24

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 24

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val

1 5 10 15

Gln Lys Val Ala Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu

20 25 30

Ala Asp Leu

35

<210> 25

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 25

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Lys Lys Leu

1 5 10 15

Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val Gln

20 25 30

Lys Val Ala

35

<210> 26

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 26

Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Lys Lys Thr

1 5 10 15

Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
20 25

<210> 27

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 27

Asp Arg Glu

1

<210> 28

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 28

Asp Glu Asp

1

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 29

His Ala Val

1

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 30

Arg Gly Asp Ser

1

<210> 31

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 31

Arg Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

1 5 10 15

Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

20 25 30

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 32

Arg Glu Asp Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

1 5 10 15

Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

20 25 30

<210> 33

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 33

Tyr Ile Gly Ser Arg Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala

1 5 10 15

Asp Leu Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp

20 25 30

Leu

<210> 34

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 34

Asp Glu Asp Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

1 5 10 15

Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

20 25 30

<210> 35

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 35

His Ala Val Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

1 5 10 15

Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

20 25 30

<210> 36

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 36

Arg Gly Asp Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu
1 5 10 15
Asp Arg Val Gln Lys Val Ala Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys
 20 25 30
Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
 35

<210> 37

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 37

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val
1 5 10 15
Gln Lys Val Ala Arg Gly Asp Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys
 20 25 30
Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
 35

<210> 38

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 38

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val

1 5 10 15
Gln Lys Val Ala Lys Lys Arg Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys
 20 25 30
Gln Tyr Glu Ala Asp Leu
 35

<210> 39

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 39

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val
1 5 10 15
Gln Lys Val Ala Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu
 20 25 30
Ala Asp Leu Arg Gly Asp
 35

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 40

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Ala Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 41

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu

1 5 10

<210> 42

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 42

Arg Gly Asp Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu

1 5 10 15

Asp Arg Val Gln Lys Val Ala Lys Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala

20 25 30

Ala His Ala Glu Ile Asn Glu

35

<210> 43

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 43

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Ala Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala

1 5 10 15

Arg Gly Asp Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala

20 25 30

Asp Leu

<210> 44

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 44

Leu Ala Val Tyr Trp Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Asp Arg Val

1 5 10 15

Gln Lys Val Ala Lys Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala

20 25 30

Glu Ile Asn Glu

35

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 45

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Ala Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala

1 5 10 15

Lys Lys Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu

20 25 30

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 46

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr

1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 47

Trp	Glu	Phe	Val	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Val	Lys	Leu	Trp	Tyr	Gln
1				5				10					15	

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 48

Lys	Arg	Lys	Arg	Ile	His	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr	Lys
1				5				10					15		

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 49

Ser	Lys	Ala	Phe	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala
1				5				10					15		

Ser Leu

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 50

Leu Val Glu Glu Thr Ser Phe Ile Asp Ala Gly Ala Pro

1

5

10

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫アジュバントを使用することなく、経粘膜投与で、抗体産生の増強を誘導することのできるポリペプチド、及び、そのポリペプチドを含有する組成物並びにその用途を提供する。

【解決手段】 ポリペプチドのアミノ末端側にマルチアグレトープ型T細胞エピトープのアミノ酸配列からなるペプチドを有し、リンカーペプチドをはさんで、カルボキシル末端側にB細胞エピトープのアミノ酸配列を有し、さらに、このポリペプチドに細胞接着分子の接着モチーフのアミノ酸配列から選ばれる何れかを単独或いは複数種結合させたポリペプチドを確立し、それを含有した組成物とその用途を提供することにより解決する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-093243
受付番号	50300523751
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 3月31日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-093243

出願人履歴情報

識別番号

[000155908]

1. 変更年月日

1998年10月21日

[変更理由]

住所変更

住所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

氏名

株式会社林原生物化学研究所